

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-126125

(43)Date of publication of application : 07.05.2003

(51)Int.Cl.

A61F 2/06
A61L 27/00

(21)Application number : 2001-326426

(71)Applicant : SAKAI KATSUKO
USHIDA TAKASHI
TATEISHI TETSUYA

(22)Date of filing : 24.10.2001

(72)Inventor : SAKAI KATSUKO
USHIDA TAKASHI
TATEISHI TETSUYA

(54) ARTIFICIAL BLOOD VESSEL AND METHOD OF PREPARING IT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an artificial blood vessel simple to prepare, excellent in bio-compatibility, mechanical strengths, anti-thrombus and the like without generating blood leakage.

SOLUTION: A bioactive substance-containing solution is prepared by impregnating the gelling solution with a bioactive substance. By entrapping the bioactive substance-containing solution within the orifice of a tubular, porous base material for artificial blood vessels under normal pressure or negative pressure and allowing the solution to gel an artificial blood vessel can be obtained over a short period of time, so that it is free from blood leakage, is excellent in anti-thrombus, dynamically excellent and has nearly uniform, smooth lumen surface.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-126125
(P2003-126125A)

(43)公開日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	データベース(参考)	
A 6 1 F	2/06	A 6 1 F	2/06	4 C 0 8 1
A 6 1 L	27/00	A 6 1 L	27/00	P 4 C 0 9 7
				R

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 11 頁)

(21)出願番号 特願2001-326426(P2001-326426)

(22)出願日 平成13年10月24日(2001.10.24)

(71)出願人 501413862

酒井 克子

東京都文京区本郷7丁目3号1番

(71)出願人 501413563

牛田 多加志

東京都文京区本郷7丁目3号1番

(71)出願人 501413574

立石 哲也

東京都文京区本郷7丁目3号1番

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 人工血管及びその製造方法

(57)【要約】

【課題】 生体適合性、機械的強度、抗血栓性等において優れ、血液の漏洩が生じず、かつ製造が容易である人工血管の提供。

【解決手段】 ゲル化する溶液に生体作用物質を含漬させて生体作用物質含有溶液を調製し、常圧又は陰圧条件下で筒状の多孔質人工血管基材の孔内に前記生体作用物質含有溶液を取り込ませ、前記多孔質人工血管基材の孔内に取り込まれた前記生体作用物質含有溶液をゲル化することによって、血液漏れが起きず、抗血栓性に優れ、内腔面がほぼ平滑であり、力学的な性質にも優れた人工血管を短期間で得ることができ、もって上記課題を解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】筒状の多孔質人工血管基材を有する人工血管において、

前記多孔質人工血管基材の孔内に生体作用物質含有ゲル溶液を含浸させてなる人工血管。

【請求項2】前記多孔質人工血管基材が、生分解性材料又は非生分解性材料から構成されることを特徴とする請求項1に記載の人工血管。

【請求項3】前記生分解性材料が、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリリンゴ酸、ポリ-ε-カプロラクトン、ε-カプロラクトンと乳酸との共重合体、ε-カプロラクトンとグリコール酸との共重合体、ε-カプロラクトンと乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ-3-ヒドロキシブチレート、ポリ-4-ヒドロキシブチレート、及び3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシブチレートとの共重合体からなる群から選ばれる1種以上の材料であることを特徴とする請求項2に記載の人工血管。

【請求項4】前記非生分解性材料が、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、ポリブタジエン系樹脂、ポリスチレン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、ポリアクリル系樹脂、ポリメタクリル系樹脂、ポリスルホン系樹脂、及びポリテトラフルオロエチレン系樹脂からなる群から選ばれる1種以上の材料であることを特徴とする請求項2に記載の人工血管。

【請求項5】前記生体作用物質が、細胞及び／又は薬学的活性成分であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の人工血管。

【請求項6】前記細胞が、平滑筋細胞、繊維芽細胞、未分化細胞、肝細胞、脾臓細胞、及び造血幹細胞からなる群から選ばれる1種以上の細胞であることを特徴とする請求項5に記載の人工血管。

【請求項7】前記生体作用物質含有ゲル溶液が、コラーゲンゲル溶液、フィブリンゲル溶液、アクリルアミドゲル溶液、アガロースゲル溶液、及びアルギン酸ゲル溶液からなる群から選ばれる1種以上のゲル溶液であって、生体作用物質を含有するものであることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の人工血管。

【請求項8】前記多孔質人工血管基材の内腔面上に、内皮細胞層が形成されていることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の人工血管。

【請求項9】前記多孔質人工血管基材が、生分解性材料又は非生分解性材料からなる補強部材によって補強されていることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載の人工血管。

【請求項10】筒状の多孔質人工血管基材を有する人工血管の製造方法において、

温度変化、pH変化、塩濃度変化、及び酵素反応変化のいずれかに対応してゲル化する溶液に生体作用物質を含浸させて生体作用物質含有溶液を調製する工程と、

常圧又は陰圧条件下で前記多孔質人工血管基材の孔内に前記生体作用物質含有溶液を取り込ませる工程と、
前記多孔質人工血管基材の孔内に取り込まれた前記生体作用物質含有溶液をゲル化する工程とを含む人工血管の製造方法。

【請求項11】前記多孔質人工血管基材を、生分解性材料又は非生分解性材料から形成することを特徴とする請求項10に記載の人工血管の製造方法。

【請求項12】前記生分解性材料が、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリリンゴ酸、ポリ-ε-カプロラクトン、ε-カプロラクトンと乳酸との共重合体、ε-カプロラクトンとグリコール酸との共重合体、ε-カプロラクトンと乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ-3-ヒドロキシブチレート、ポリ-4-ヒドロキシブチレート、及び3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシブチレートとの共重合体からなる群から選ばれる1種以上の材料であることを特徴とする請求項11に記載の人工血管の製造方法。

【請求項13】前記非生分解性材料が、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、ポリブタジエン系樹脂、ポリスチレン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、ポリアクリル系樹脂、ポリメタクリル系樹脂、ポリスルホン系樹脂、及びポリテトラフルオロエチレン系樹脂からなる群から選ばれる1種以上の材料であることを特徴とする請求項11に記載の人工血管の製造方法。

【請求項14】前記生体作用物質が、細胞及び／又は薬学的活性成分であることを特徴とする請求項10～13のいずれかに記載の人工血管の製造方法。

【請求項15】前記細胞が、平滑筋細胞、繊維芽細胞、未分化細胞、肝細胞、脾臓細胞、及び造血幹細胞からなる群から選ばれる1種以上の細胞であることを特徴とする請求項14に記載の人工血管の製造方法。

【請求項16】ゲル化する前記溶液が、コラーゲン溶液、フィブリン溶液、アクリルアミド溶液、アガロース溶液、及びアルギン酸溶液からなる群から選ばれる1種以上の溶液であることを特徴とする請求項10～15のいずれかに記載の人工血管の製造方法。

【請求項17】請求項10～16のいずれかに記載の人工血管の製造方法において、

前記多孔質人工血管基材の孔内に取り込まれた前記生体作用物質含有溶液をゲル化した前記多孔質人工血管基材の内腔面上に、内皮細胞層を形成する工程を更に含むことを特徴とする人工血管の製造方法。

【請求項18】請求項10～17のいずれかに記載の人工血管の製造方法において、

前記多孔質人工血管基材が、生分解性材料又は非生分解性材料からなる補強部材によって補強されていることを特徴とする人工血管の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、心・脳疾患系、さらに四肢の末梢血管などを含む人体のあらゆる血管の疾患の治療に際して使用される人工血管に関するものであり、より詳しくは、多孔質人工血管基材とゲルと生体作用物質とを複合化した人工血管に関する。

【0002】

【従来の技術】大口径（内径が約5mm～約30mm）の人工血管は、先天性疾患、動脈硬化症といった血管疾患の治療に際して使用される。このような人工血管としては、ポリエステル性の線維や伸展性の4塩化フッ素化合物などの材料で作製された人工血管が臨床で用いられている。大口径の人工血管は、このような材料によって作製されていても十分な血流速度が確保されるため、臨床的に十分な成果が得られている。

【0003】一方、小口径（内径が約0.5mm～約5mm）の人工血管は、動脈硬化症、血管れん縮、末梢血管の損傷、瘤形成、腫瘍の浸潤といった血管疾患の治療に際して需要が非常に高いものである。しかしながら、小口径の人工血管においては、小口径であるがゆえに上述の材料では十分な血流速度を確保し得る抗血栓性に優れた人工血管を得ることはできなかった。また、上述のような材料は非生分解性材料であり、生体適合性も悪く、かつ移植後にも異物が体内に残存することになるという問題がある。

【0004】一方、生体適合性、抗血栓性を考慮して、平滑筋を含有し、内皮細胞の層を内腔面上に形成できるような平滑な内腔面を有する、人工的な筒状物質を形成したハイブリッド型人工血管モデルが提唱されている。

【0005】このようなモデルとして、具体的には、平滑筋を混合させたゲル状のコラーゲンを筒状構造体に成型するモデルが提唱されている（Weinberg et al. Science, 1986, 231, p397-400; Hirai et al. ASAIO journal, 1994, p383-388）。このモデルによれば、短時間で平滑な内腔面を有する人工血管を形成することができる。しかしながら、このような筒状構造体は脆弱であるため、作製直後はビンセットで持ち上げることができない等、極めて扱いにくく、また、血圧などの生体内に存在する力学的な環境に耐えることができないという問題があった。

【0006】また、生分解性又は非生分解性の筒状の構造体に平滑筋細胞を含有させた培養溶液を直接播種させ、これによって内腔面が平滑になるまで培養させた後に内皮細胞を播種させるモデルも提唱されている（Niklason et al. Science, 1999, 284, p489-493、特開2001-78750号公報）。これらモデルによれば、機械的強度に優れ、動脈レベルの人工血管としても耐えられるものである。しかしながら、生分解性又は非生分解性の筒状構造体は、疎水性が強く、細胞の接着、および増殖が著しく悪いことが知られている。このため、平滑な内腔面を形成するまで筒状構造体内の平滑筋細胞を培養させるの

に数ヶ月という長い培養時間を要するという問題があった。これは、人工血管を必要とする患者の状況を考慮すると実用的なものであるとはいえなかった。また、筒状構造体による平滑筋細胞の補足率も低く、筒状構造体の隙間から血液が漏れる恐れがあるという問題があった。また、当該モデルによれば、その機械的強度が高いゆえに、移植後に自己の血管との間で摩擦が生じて、結合部に切れ目が生じ、血液が漏れる恐れがあるという問題もあった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、生体適合性、機械的強度、抗血栓性等において優れ、血液の漏洩が生じず、かつ製造が容易である人工血管が望まれている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意検討した結果、適度な機械的強度を有するファイバー（繊維）状またはスポンジ状の材料から形成された筒状の多孔質人工血管基材を、細胞を混合した溶液に常圧又は陰圧条件下で含浸させ、孔内に細胞含有溶液を取り込ませた後に、当該溶液をゲル化させることによって、短時間で多孔質人工血管基材の細部にまで高密度で細胞を浸透させ、かつ保持させることができることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】また、本発明者らは、上記と同様の方法で、細胞のみならず、生体内で合成される生理活性物質やそれらの生理活性物質をコードする遺伝子、生体外で合成もしくは得られる医薬化合物等といった薬学的活性成分を多孔質人工血管基材に取り込むことができ、ドラッグデリバリーシステム、人工血管以外の人工臓器を含む、様々な用途の人工血管として対応できる人工血管を提供できることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】即ち、本発明では、筒状の多孔質人工血管基材を有する人工血管において、前記多孔質人工血管基材の孔内に生体作用物質含有ゲル溶液を含浸させてなる人工血管が提供される。

【0011】また、本発明では、筒状の多孔質人工血管基材を有する人工血管の製造方法において、温度変化、pH変化、塩濃度変化、及び酵素反応変化のいずれかに対応してゲル化する溶液に、生体作用物質を含浸させて生体作用物質含有溶液を調製する工程と、常圧又は陰圧条件下で前記多孔質人工血管基材の孔内に前記生体作用物質含有溶液を取り込ませる工程と、前記多孔質人工血管基材の孔内に取り込まれた前記生体作用物質含有溶液をゲル化する工程とを含む人工血管の製造方法が提供される。

【0012】本発明において、前記多孔質人工血管基材が、生分解性材料又は非生分解性材料から構成されることが好ましい。また、前記生分解性材料は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリリンゴ酸、ポリ-ε-カプロラクトン、ε-カプロ

ラクトンと乳酸との共重合体、 ϵ -カプロラクトンとグリコール酸との共重合体、 ϵ -カプロラクトンと乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ-3-ヒドロキシブチレート、ポリ-4-ヒドロキシブチレート、及び3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシブチレートとの共重合体からなる群から選ばれる1種以上の材料であることが好ましい。また、前記非生分解性材料は、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、ポリブタジエン系樹脂、ポリスチレン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、ポリアクリル系樹脂、ポリメタクリル系樹脂、ポリスルホン系樹脂、及びポリテトラフルオロエチレン系樹脂からなる群から選ばれる1種以上の材料であることが好ましい。

【0013】また、本発明において、前記生体作用物質が、細胞及び／又は薬学的活性成分であることが好ましい。また、前記細胞は、平滑筋細胞、繊維芽細胞、未分化細胞、肝細胞、脾臓細胞、及び造血幹細胞からなる群から選ばれる1種以上の細胞であることが好ましい。

【0014】また、本発明にかかる人工血管において、前記生体作用物質含有ゲル溶液が、コラーゲンゲル溶液、フィブリンゲル溶液、アクリルアミドゲル溶液、アガロースゲル溶液、及びアルギン酸ゲル溶液からなる群から選ばれる1種以上のゲル溶液であって、生体作用物質を含有するものであることが好ましい。

【0015】また、本発明にかかる人工血管の製造方法において、ゲル化する前記溶液が、コラーゲン溶液、フィブリン溶液、アクリルアミド溶液、アガロース溶液、及びアルギン酸溶液からなる群から選ばれる1種以上の溶液であることが好ましい。

【0016】また、本発明にかかる人工血管において、前記多孔質人工血管基材の内腔面上に、内皮細胞層が形成されていてもよい。

【0017】また、本発明にかかる人工血管の製造方法において、前記多孔質人工血管基材の孔内に取り込まれた前記生体作用物質含有溶液をゲル化した前記多孔質人工血管基材の内腔面上に、内皮細胞層を形成する工程を更に含んでいてもよい。

【0018】また、本発明において、前記多孔質人工血管基材が、生分解性材料又は非生分解性材料からなる補強部材によって補強されていてもよい。

【0019】

【発明の実施の形態】本発明にかかる人工血管は、筒状の多孔質人工血管基材を有するものであり、その孔内に生体作用物質含有ゲル溶液を含むものである。

【0020】まず、本発明で用いられる多孔質人工血管基材について説明する。本発明で使用される多孔質人工血管基材は、多孔質であり、生体作用物質を孔内に取り込みやすくする観点から、孔同士がつながったオープンポア構造のものが好ましい。孔の割合は、基材の70%～99%であることが好ましく、80%～95%である

ことが更に好ましい。

【0021】また、本発明で用いられる多孔質人工血管基材は、筒状であり、例えば、小口径人工血管として用いる場合は、内径が1mm～7mmであることが好ましく、1mm～5mmであることが更に好ましく、1mm～4mmであることが更にまた好ましい。

【0022】従来、動脈硬化症、血管れん縮、末梢血管の損傷、瘤形成、腫瘍の浸潤といった小口径血管の疾患の治療にあつては、他の部位の自己血管の再移植、あるいは、疾患が全身性の症状であり自己血管の移植が適切でない場合は四肢の切断といった処置が取られていた。本発明にかかる人工血管を小口径人工血管として用いる場合は、上記の血管疾患の治療にあつても、従来取られていた処置を施すことなく、その治療を可能にし、手術の緊急性、患者の負担等を考えると好ましい。

【0023】また、大口径人工血管として用いる場合は、内径が5mm～70mmであることが好ましく、5mm～50mmであることが更に好ましい。

【0024】また、本発明で用いられる多孔質人工血管基材の材料としては、生分解性材料、非生分解性材料等を挙げることができる。生体内での異物反応、免疫反応、発ガン性など考慮して、移植後に生体由来でない成分は溶けてなくなる人工血管を提供するという観点からは生分解性材料であることが好ましい。また、移植後に溶けてなくなるため、機械的強度を保持でき、現段階、現技術開発レベルで安定した商品を生供給するという観点からは非生分解性材料であることが好ましい。

【0025】生分解性材料としては、特に制限はないが、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリリンゴ酸、ポリ- ϵ -カプロラクトン、 ϵ -カプロラクトンと乳酸との共重合体、 ϵ -カプロラクトンとグリコール酸との共重合体、ポリ-3-ヒドロキシブチレート、ポリ-4-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシブチレートとの共重合体等を挙げることができ、厚生労働省、FDA（米国食品医薬品局）の認可という観点からは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体であることが好ましい。

【0026】非生分解性材料としては、特に制限はないが、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、ポリブタジエン系樹脂、ポリスチレン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、ポリアクリル系樹脂、ポリメタクリル系樹脂、ポリスルホン系樹脂、ポリテトラフルオロエチレン系樹脂等を挙げることができ、厚生労働省、FDAの認可という観点からは、ポリエチレン系樹脂、ポリテトラフルオロエチレン系樹脂であることが好ましい。

【0027】本発明で使用される筒状の多孔質人工血管基材の製造方法としては、例えば、上述した材料の溶液に、塩化ナトリウム、炭酸水素アンモニウム等の発泡剤

を混合して筒状に成型し、その後発泡させて多孔質状にするという方法を挙げることができる。このような方法としては、例えば、Nam et al. J.Biomed. Mater. Res. 2000, 53, pt-7に記載された方法を挙げることができる。

【0028】次に、上記多孔質人工血管基材の孔内に含まれる、生体作用物質含有ゲル溶液について説明する。

【0029】本発明で使用される生体作用物質含有ゲル溶液は、生体作用物質を含むゲル溶液であり、生体作用物質を均一に混合させたものであることが好ましい。

【0030】ゲル溶液に含まれる生体作用物質としては、細胞、薬学的活性成分等を挙げることができ、これらの1種類以上であってもよい。このような生体作用物質は、人工血管の用途に応じて適宜定めることができる。

【0031】本明細書において、薬学的活性成分とは、生体内において一種以上の薬理活性を示す成分をいい、例えば、生体内で合成される生理活性物質、それらの生理活性物質をコードする遺伝子、生体外で合成もしくは得られる医薬化合物等を挙げることができる。

【0032】生体作用物質として使用される細胞としては、例えば、幹細胞やES系細胞等の未分化細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、肝細胞、脾臓細胞、造血幹細胞等を挙げることができる。

【0033】生体作用物質として使用される生理活性物質としては、生体内で合成されるタンパク質を挙げることができ、例えば、インシュリン、抗プリオン抗体、抗エイズウイルス抗体等を挙げることができる。このような生理活性物質を生体作用物質として含む人工血管としては、糖尿病、感染症等の疾患の治療を兼ねた人工血管といった用途がある。

【0034】生体作用物質として使用される遺伝子としては、上述した生理活性物質をコードする遺伝子を挙げることができ、例えば、アデノシンデアミナーゼをコードする遺伝子、第8血液凝固因子をコードする遺伝子、第9血液凝固因子をコードする遺伝子等を挙げることができる。遺伝子を生体作用物質として含む人工血管としては、アデノシンデアミナーゼ欠損症、血友病等の疾患の治療を兼ねた人工血管といった用途がある。

【0035】また、生体作用物質として生体外で合成もしくは得られる医薬化合物を使用することもできる。このような医薬化合物としては、有機化合物、自然界に存在する微生物などによって産生させる抗生物質等を挙げることができ、具体的には、ペニシリン、シクロホスファミド、アクチノマイシンD、5-フルオロウシシル、ブレオマイシン等を挙げることができる。このような医薬化合物を生体作用物質として含む人工血管としては、感染症、抗ガン治療などを兼ねた人工血管といった用途がある。

【0036】多孔質人工血管基材が生分解性材料から構

成されている場合は、人工血管移植後の機械的強度を担保するという観点から、ゲル溶液には、少なくとも、平滑筋細胞、繊維芽細胞、未分化細胞が含まれていることが好ましい。

【0037】ゲル溶液に混合させる生体作用物質の密度は、生体作用物質が細胞の場合には、 $1 \times 10^4 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^9 \text{ cell/ml}$ であることが好ましく、 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ であることが更に好ましい。

【0038】また、ゲル溶液としては、温度、pH、塩濃度、酵素反応などの変化によってゲル化する溶液をゲル化させたものであり、毒性や発ガン性のないものであれば特に制限はなく使用することができる。温度変化に対応してゲル化するものとしては、例えば、コラーゲン、アクリルアミド系の樹脂、アガロースを挙げることができる。また、pH変化に対応してゲル化するものとしては、コラーゲン等を挙げることができる。また、塩濃度の変化に対応してゲル化するものとしては、アルギン酸等を挙げることができる。また、酵素反応に対応してゲル化するものとしては、フィブリン等を挙げることができ、ゲル化させる酵素としては、例えば、フィブリンノーゲン等を挙げることができる。

【0039】本発明の人工血管は、多孔質人工血管基材の孔内に生体作用物質含有ゲル溶液が取り込まれている。生体作用物質含有ゲル溶液は、血液の漏れを防ぎ、更に血管内皮細胞の足場を確保する観点から、多孔質人工血管基材の全孔の50%以上を占めることが好ましく、90%以上を占めることが更に好ましい。

【0040】本発明にかかる人工血管は、抗血栓性を良好にする観点から、多孔質人工血管基材の内腔面上に内皮細胞層が形成されていてもよい。

【0041】また、本発明にかかる人工血管において、機械的強度を更に良好にするため、多孔質人工血管基材を生分解性材料又は非生分解性材料からなる補強部材によって補強されていてもよい。補強部材は、多孔質人工血管基材の外周面上及び／又は内周面上に形成されていてもよく、また、多孔質人工血管基材内部に組み込まれていてもよい。多孔質人工血管基材の外周面上に形成された補強部材としては、多孔質人工血管基材の外径と略同一の内径を有し、断面が基材と同心円となるように基材に被覆された筒状の部材を挙げることができる。また、多孔質人工血管基材の内周面上に形成された補強部材としては、多孔質人工血管基材の内径と略同一の外径を有し、断面が基材と同心円となるように基材に被覆された筒状の部材を挙げることができる。いずれも、繊維状の生分解性材料又は非生分解性材料を網目状に織ることによって形成したもの等を挙げることができる。また、このような網目状の補強部材を、多孔質人工血管基材を成型する際に予め組み込むことによって、補強部材を多孔質人工血管基材内に組み込むこともできる。なお、生分解

性材料及び非生分解性材料としては、多孔質人工血管基材の材料として上述したものを挙げることができる。

【0042】次に、本発明にかかる人工血管の製造方法について説明する。

【0043】まず、温度変化、pH変化、塩濃度変化及び酵素反応変化のいずれかに対応してゲル化する溶液に生体作用物質を混合し、生体作用物質含有溶液を調製する。混合させる生体作用物質としては、人工血管の用途に応じて適宜定めることができ、上記で説明した物質を挙げることができる。また、ゲル化する溶液中に混合させる生体作用物質の密度は、生体作用物質が細胞の場合には、 $1 \times 10^4 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^9 \text{ cell/ml}$ であることが好ましく、 $1 \times 10^6 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ であることが更に好ましい。

【0044】続いて、予め用意した多孔質人工血管基材を、上述のように調製した生体作用物質含有溶液に含浸し、常圧条件下、好ましくは陰圧条件下で基材の孔内に生体作用物質含有溶液を取り込ませる。

【0045】多孔質人工血管基材の材料及び製造方法については、上述した通りである。また、多孔質人工血管基材は、補強部材によって補強されていてもよい。補強部材および補強方法については、上述した通りである。

【0046】多孔質人工血管基材の生体作用物質含有溶液への含浸方法としては、常圧条件下、好ましくは陰圧条件下で生体作用物質含有溶液に多孔質人工血管基材を浸漬して静置するといった方法を挙げることができる。基材内に生体作用物質を取り込ませるためには、生体作用物質が多孔質人工血管基材の孔内に十分取り込まれるまで含浸させる。例えば、生体作用物質含有溶液に多孔質人工血管基材を含浸させて、10分～60分静置させることが好ましく、30分～60分静置させることが更に好ましい。

【0047】添加時の圧力は、常圧でもよいが、効率的に生体作用物質を基材の孔内に取り込ませる観点から、大気圧よりも低い圧力が好ましい。この圧力は、使用する材料、機材の耐圧性、使用する生体作用物質の活性保持可能性などを考慮して、適宜決定される。

【0048】続いて、多孔質人工血管基材の孔内に取り込まれた生体作用物質含有溶液をゲル化させる。ゲル化条件は、使用する溶液に合わせて適宜設定する。ゲル化させる際には、平滑な内腔面を形成する観点から、ゲル化条件下で更に、10分～120分静置させることが好ましく、30分～60分静置させることが更に好ましい。

【0049】本発明にかかる人工血管の製造方法において、多孔質人工血管基材の内腔面上に、内皮細胞層を形成させることができる。内皮細胞層は、ゲル化した生体作用物質含有溶液を孔内に保持した多孔質人工血管基材の内腔内に、内皮細胞を含有する培養液を流し込み、回

転培養させることによって容易に形成することができる。

【0050】内皮細胞培養の際の回転数は、0.5rpm～100rpmであることが好ましく、5rpm～10rpmであることが更に好ましい。また、培養時間は、10分～24時間であることが好ましく、20分～60分であることが更に好ましい。

【0051】本発明によれば、筒状の多孔質人工血管基材の孔内に、生体作用物質を高密度で含み、血液漏れが起きず、内腔面がほぼ平滑であり、また、多孔質人工血管基材を有するため、力学的な性質にも優れた人工血管を提供することができる。

【0052】また、本発明によれば、生体作用物質を短時間で効率よく高密度に人工血管へ組み込みことができる。

【0053】

【実施例】以下に実施例をもって本発明を具体的に説明する。

【0054】参考例（多孔質人工血管基材の調製）
重量平均分子量約300,000のポリ乳酸320mgをクロロホルム4mlで完全に溶かして液状にした後に、炭酸水素アンモニウムの結晶5gを混合させた。内径が5mm、外径が7mmの鋳型に上述のポリマーを流し込み、形を整えた後、鋳型からポリマーをとり出し、クロロホルムを完全に蒸発させるために、50℃で24時間加熱した。次に、3次元的なスポンジ構造を作製するために、筒状のポリマーを80℃で10分加熱し、炭酸アンモニウムを溶出した。超純水で筒状ポリマーを十分に洗浄した後に、凍結乾燥して、内径約5mm、外径約7mm、長さ約20mmのポリ乳酸から構成される多孔質人工血管基材（以下、「PLLA基材」という）を作製した。

【0055】実施例1

0.39%のコラーゲン溶液に、 $5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ の濃度でヒト正常大動脈血管平滑筋細胞を混合させた溶液を作製した。次に、参考例で作製したPLLA基材を、ガラス製のチューブに入れ、上述のヒト正常大動脈血管平滑筋細胞含有コラーゲン溶液1.4mlに浸漬し、これを油圧式ポンプ（ULVAC社製、G-5）によって減圧して、陰圧条件下で30分間静置した。続いて、外径が5mmのチューブをPLLA基材の中心に挿入した後に、37℃のインキュベータに移動させ、60分間静置することによって、PLLA基材内のコラーゲン溶液をゲル化させ、人工血管を作製した。

【0056】比較例1

培養溶液（ダルベッコ最小必須培地（DMEM））に、ヒト正常大動脈血管平滑筋細胞を混合させ、 $5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ の濃度の細胞含有溶液を作製した。次に、参考例で作製したPLLA基材をガラス製のチューブに入れ、上述のヒト正常大動脈血管平滑筋細胞含有培養溶液

1. 4 ml に浸漬し、これを油圧式ポンプ (ULVAC 社製、G-5) によって減圧して、陰圧条件下で 30 分間静置した。続いて、外径が 5 mm のチューブを PLLA 基材の中心に挿入した後に、37℃ のインキュベータに移動させ、60 分間静置し、人工血管を作製した。

【0057】(1) 取り込まれた細胞数の比較

実施例 1 および比較例 1 で作製した人工血管に取り込まれたヒト正常大動脈血管平滑筋細胞の数を比較した。比較は、PLLA 基材を浸漬する前のヒト正常大動脈血管平滑筋細胞溶液中の細胞数に対する、PLLA 基材を浸

漬後取り出した後の溶液中の細胞数の割合 (%) を計算することにより行った。細胞の数は、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸 (DAPI) によって発色させた核の数を、蛍光分光光度計を用いて算出することにより行った。なお、浸漬時間は 30 分であるため、この時間内に平滑筋細胞が増殖することはない。下記の表 1 に取り込まれた細胞の割合を示す。

【0058】

【表 1】

	実施例 1	比較例 1
取り込まれた細胞の割合 (%)	100%	18%

表 1 から、比較例 1 で作製した人工血管に比べ、実施例 1 で作製した人工血管は、極めて効率的に細胞を取り込んでいることがわかる。

【0059】(2) 人工血管の内腔面の状態の比較

実施例 1 および比較例 1 で作製した人工血管の内腔面の状態を調べた。細胞を安定化するため、それぞれの人工血管を更に 1 日培養したものを観察に用いた。実施例 1 で作製した人工血管の内腔面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真 (スケール 100 μm) を図 1 に、比較例 1 で作製した人工血管の内腔面の SEM 写真を図 2 に、参考のために参考例で作製した PLLA 基材の内腔面の状態の SEM 写真を図 3 に示した。図 1 及び図 2 から、比較例 1 の人工血管の内腔面は孔が未だに多いのに比べ、実施例 1 の人工血管の内腔面は孔がなく、平滑になっていることがわかる。

【0060】(3) 人工血管の内腔面側の細胞密度の比較

実施例 1 および比較例 1 で作製した人工血管の内腔面側の細胞密度を調べた。細胞を安定化するため、それぞれの人工血管を更に 1 日培養した後、それぞれの人工血管の断面切片 (厚さ 8 μm) を作製し、ヒト正常大動脈血管平滑筋細胞の核をヘキスト (ヘキスト社製) 100 ng/ml で染色した。図 4 に実施例 1 で作製した人工血管の断面の蛍光写真、図 5 に比較例 1 で作製した人工血管の断面の蛍光写真を示した。なお、図中点線は、内腔面を示すものである。図 4 及び図 5 から、比較例 1 で作製した人工血管に比べ、実施例 1 で作製した人工血管のほうが高密度で細胞が取り込まれていることがわかる。

【0061】実施例 2

5.0×10^6 cells/ml の濃度で正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を含有した培養溶液を 1 ml 調製し、実施例 1 で作製した人工血管の内腔内に流し込んだ。回転培養装置 (タイテック社、RT-50) を用いて、5 rpm ~ 10 rpm の回転速度で回転させながら 60 分間培養することによって、内皮細胞層を形成させた。

【0062】(4) 人工血管の内腔面上の内皮細胞層

実施例 2 で作製した人工血管の内腔面上に形成させた内皮細胞の様子を調べた。細胞を安定化するため、人工血管を更に 1 日培養した後、人工血管の断面切片 (厚さ 8 μm) を作製し、内皮細胞をアセチル化低密度リポ蛋白 (LDL) で染色した。図 6 に上記の人工血管の断面の透過型顕微鏡写真を、図 7 に同じ断面の蛍光写真を示した。なお、図 7 中の矢印は、内皮細胞層を示すものである。図 6 及び図 7 から、実施例 2 で作製した人工血管の内腔面上には、連続的に内皮細胞層が形成されていることがわかる。

【0063】

【発明の効果】以上に述べたように、本発明によれば、人工血管に必要な不可欠な、血液と直接接する最内腔面の短期間における平滑化が可能であり、短時間で効率のよい生体作用物質の人工血管への組み込みが可能である。

【0064】また、本発明によれば、血液漏れが起きず、抗血栓性に優れ、内腔面がほぼ平滑であり、力学的な性質にも優れた人工血管を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 で作製された人工血管の内腔面の走査型電子顕微鏡による観察像である。

【図 2】 比較例 1 で作製された人工血管の内腔面の走査型電子顕微鏡による観察像である。

【図 3】 参考例で作製された PLLA 基材の内腔面の走査型電子顕微鏡による観察像である。

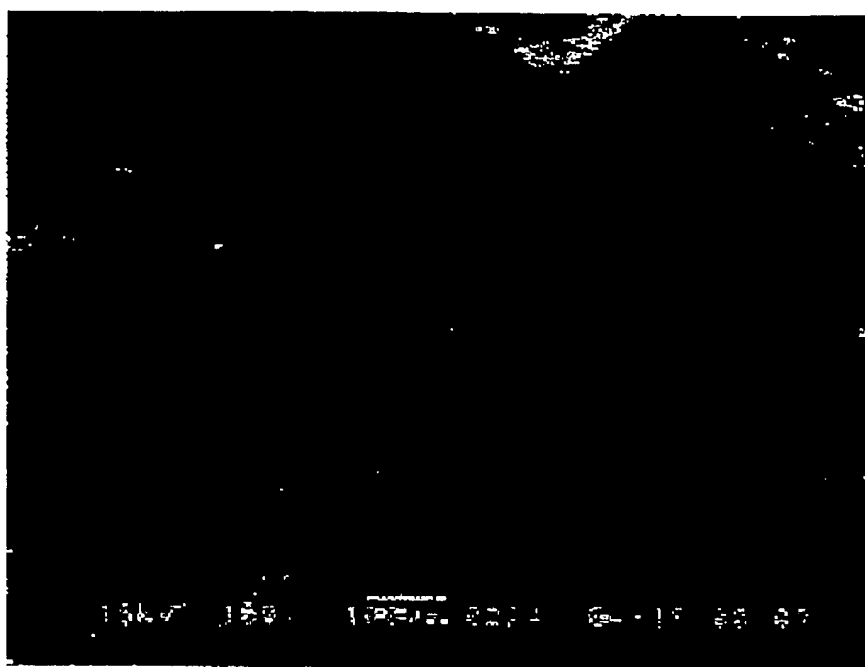
【図 4】 実施例 1 で作製された人工血管の蛍光顕微鏡による断面像である。

【図 5】 比較例 1 で作製された人工血管の蛍光顕微鏡による断面像である。

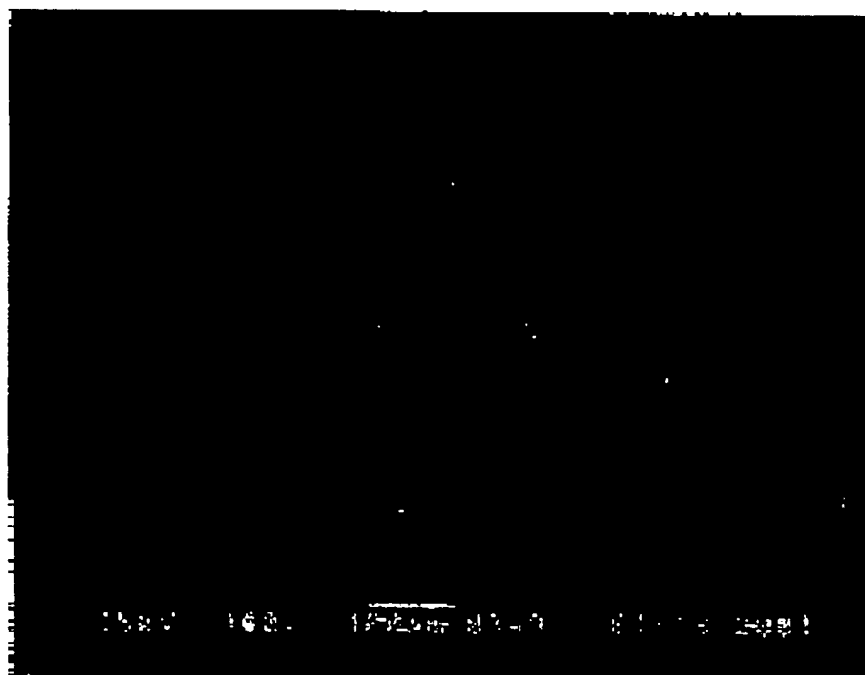
【図 6】 実施例 2 で作製された人工血管の透過型顕微鏡による断面像である。

【図 7】 実施例 2 で作製された人工血管の蛍光顕微鏡断面像である。

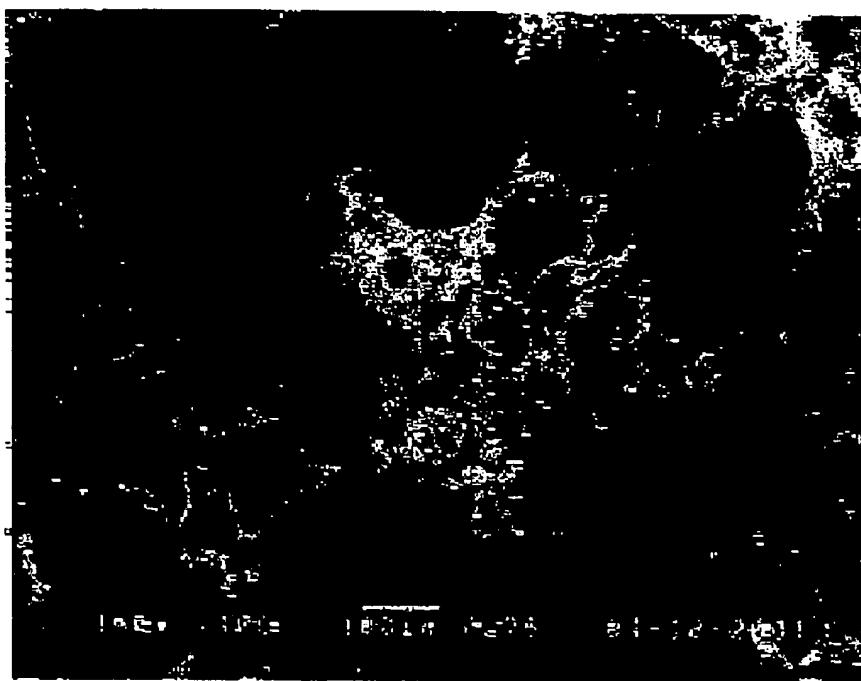
【図1】



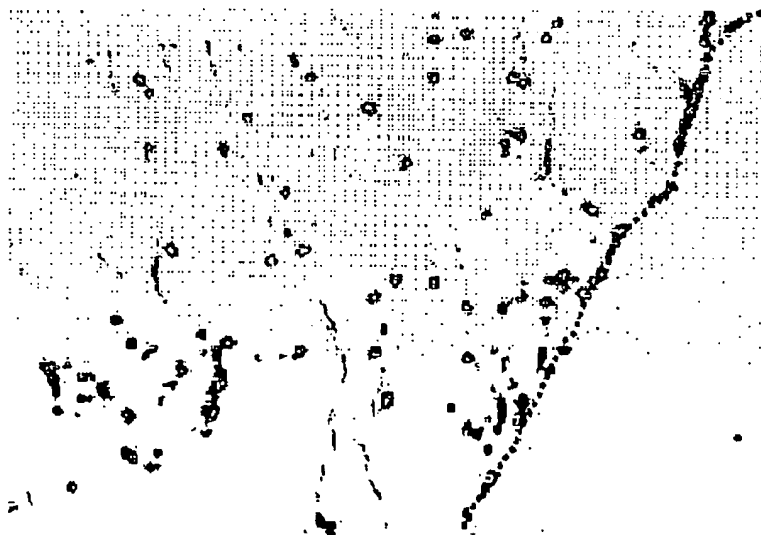
【図2】



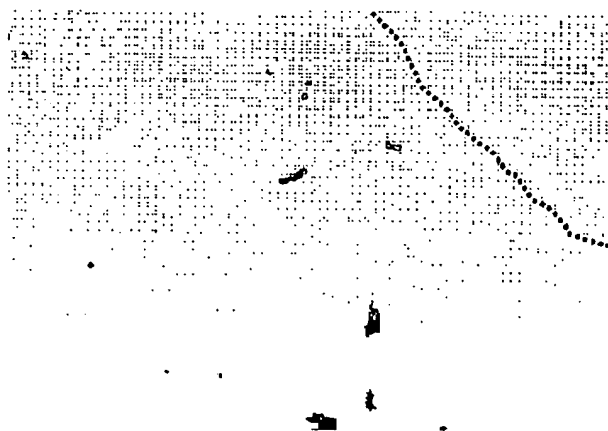
【図3】



【図4】



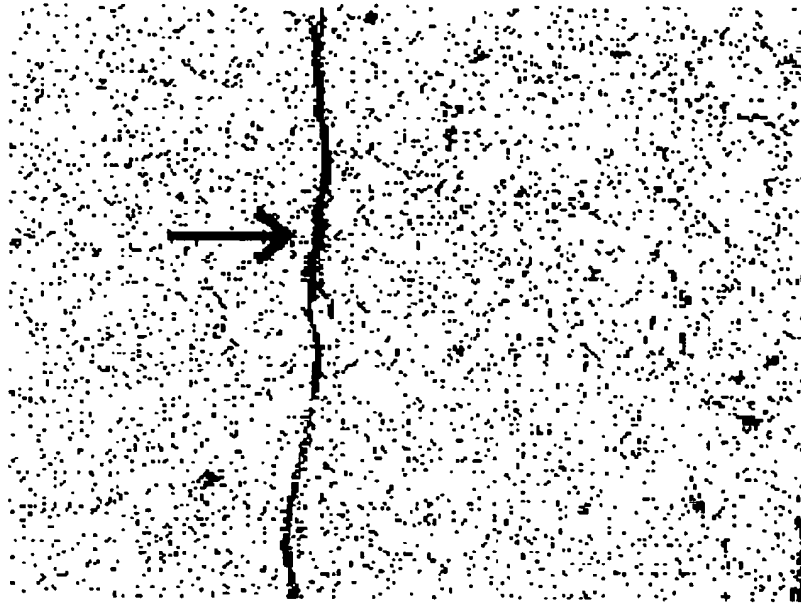
【図5】



【図6】



【図 7】



フロントページの続き

(72)発明者 酒井 克子
東京都文京区本郷7丁目3番1号
(72)発明者 牛田 多加志
東京都文京区本郷7丁目3番1号
(72)発明者 立石 哲也
東京都文京区本郷7丁目3番1号

Fターム(参考) 4C081 AB13 BA05 CA021 CA031
CA041 CA081 CA121 CA131
CA171 CA281 CB011 CC01
CD34 DA03 DB03 EA02 EA03
4C097 AA15 BB01 CC01 DD02 DD15
EE02 EE03 EE04 EE06 EE08
FF01 FF03 FF05 MM02 MM04

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.